REGULATION OF NEURAL DIFFERENTIATION IN HUMAN PLURIPOTENT EMBRYONAL CARCINOMA STEM CELLS BY RNA SIGNALING

RUJAPOPE SUTIWISESAK

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(NEUROSCIENCES)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2014

Copyright by Mahidol University

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

REGULATION OF NEURAL DIFFERENTIATION IN HUMAN PLURIPOTENT EMBRYONAL CARCINOMA STEM CELLS BY RNA SIGNALING

RUJAPOPE SUTIWISESAK 4801156 MBNS/D

Ph.D.(NEUROSCIENCES)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: NAIPHINICH KOTCHABHAKDI, Ph.D., PIYARAT GOVITRAPONG, Ph.D., VORASITH SIRIPORNPANICH, M.D., Dip Thai Board of Ped Neuro, NARISORN KITIYANANT, D.V.M., Ph.D.

ABSTRACT

Pluripotent stem cells are important sources for cell-based therapy, including treatment for neurological deficits. Understanding the process of neural differentiation is important for the development of methods needed to differentiate specific neural cells for treatment. It can also be a platform for studying pathogenesis of neurodevelopmental disorder. In the present study, human pluripotent embryonal carcinoma stem cells, NTERA2, were used as a model to study the neural differentiation process via induction by retinoic acid. The regulation by Paired-box 6 (PAX6), a transcription factor which has been shown as a neural fate determinant of human embryonic stem cells, was tested. An RNA-protein complex comprised of RNA signaling molecules; including CTCF, DDX5 and PUS1, with a long non-coding RNA, namely steroid receptor RNA co-activator (*SRA*), has been shown to regulate transcriptional activity at different targets. However, CTCF is the only component in the complex shown to regulate PAX6, the information of other components is still missing. Chromatin immunoprecipitation experiment was employed to identify the association of those proteins to the regulatory elements of *PAX6* gene. Furthermore, the involvement of the RNA-protein complex in differentiation of NTERA2 was evaluated by loss of function and gain of function experiments, coupled with differentiation induced with retinoic acid treatment. The results revealed that both PAX6A and PAX6B isoforms are able to specify neural differentiation in NTERA2 cells. The association of PUS1 to P1 promoter provides an indication of the role of PUS1 on initiation of *PAX6* transcription, while CTCF and DDX5 associations suggest a stabilizing mechanism for the transcription. Loss of *SRA* induced neural differentiation, while loss of DDX5 and PUS1 favored differentiation into other lineages and suppressed *PAX6* expression. Over-expression of DDX5 and DDX17 in NTERA2 cells increased neural differentiation for which DDX17 was important for maturation of neuronal cells. Over-expression of PUS1 resulted in faster advancing the process of neural differentiation and expression of PAX6, whereas results from over-expression of catalytic inactive mutant form of PUS1 were not different compared to that of control. These results suggest a relationship between RNA pseudo-uridylation and transcription of PAX6 gene, which further suggests an engagement of RNA structure to the transcriptional machinery. In conclusion, this study demonstrates the collaboration between RNA and protein structure on regulation of gene expression as well as the process of neural differentiation from pluripotent stem cells.

KEY WORDS: HUMAN PLURIPOTENT EMBRYONAL CARCINOMA STEM CELLS / NEURAL DIFFERENTIATION / PAX6 / RNA SIGNALING

Copyright© by Mahidol University

161 pages

การควบคุมการเปลี่ยนแปลงเซลล์มะเร็งต้นกำเนิดให้เป็นเซลล์ประสาทด้วยสัญญาณอาร์เอ็นเอ

REGULATION OF NEURAL DIFFERENTIATION IN HUMAN PLURIPOTENT EMBRYONAL CARCINOMA STEM CELLS BY RNA SIGNALING

รุจภพ สุทธิวิเศษศักดิ์ 4801156 MBNS/D

ปร.ด.(ประสาทวิทยาศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: นัยพินิจ คชภักดี, Ph.D., ปิยะรัตน์ โกวิทตรพงศ์, Ph.D., วรสิทธิ์ ศิริพรพาณิชย์, M.D., Dip Thai Board of Ped Neuro, นริศร กิติยานันท์, D.V.M., Ph.D.

บทคัดย่อ

เซลล์ต้นกำเนิดแบบ pluripotent เป็นแหล่งสำคัญสำหรับการทำเซลล์บำบัด ซึ่งสามารถใช้ในการรักษาโรคทางระบบประสาทได้ การทำความเข้าใจกระบวนการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ในระบบประสาทจากเซลล์ต้นกำเนิดจึงมีความสำคัญต่อการผลิตเซลล์เพื่อนำไปใช้ในการรักษา และความเข้าใจดังกล่าวยังสามารถต่อยอดการศึกษากระบวนการก่อโรคของโรคพัฒนาการทางระบบประสาทได้อีกด้วย ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ในระบบประสาทโดยใช้เซลล์มะเร็งต้นกำเนิด NTERA2 ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยสาร retinoic acid โดยศึกษาผลของ Paired-box 6 (PAX6) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของมนุษย์ให้เป็นเซลล์ในระบบประสาท และศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีน PAX6 ภายใต้การควบคุมของ RNA-protein complex จากการรวมตัวกันของ CTCF, DDX5 และ PUS1 ที่สร้างพันธะร่วมกับ RNA ชื่อ steroid receptor RNA co-activator (SRA) ซึ่งมีเพียง CTCF ที่มีการยืนยันความสัมพันธ์กับการควบคุมการแสดงออกของยีน PAX6 ผู้วิจัยยังได้ศึกษาความเชื่อมโยงระหว่าง RNA-protein complex ดังกล่าวกับการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ NTERA2 ผลการศึกษาแสดงว่า ทั้งไอโซฟอร์มPAX6A และ PAX6B สามารถกำหนดให้เซลล์ NTERA2 เปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์ในระบบประสาท PUS1 มีความเกี่ยวข้องกับการเริ่มต้นถอดรหัสยีน PAX6 ผ่าน P1 promoter ในขณะที่บทบาทของ CTCF และ DDX5 คือการควบคุมความเสถียร เมื่อลดปริมาณ SRA พบว่าเซลล์ NTERA2 เปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์ของระบบประสาท ในขณะที่เมื่อลด DDX5 และ PUS1 ให้ผลตรงกันข้าม เมื่อเพิ่มปริมาณ DDX5 และ DDX17 สามารถเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ระบบประสาทเพิ่มขึ้น โดย DDX17 สำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงให้เป็นเซลล์ประสาทที่สมบูรณ์ เมื่อเพิ่มปริมาณของ PUS1 ส่งผลให้กระบวนการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ในระบบประสาท และการแสดงออกของ PAX6 เกิดเร็วขึ้น ในขณะที่ผลดังกล่าวไม่เกิดกับการเพิ่มปริมาณของ PUS1 ในรูปแบบที่ทำปฏิกิริยากับ RNA ไม่ได้ ผลการวิจัยนี้สรุปได้ว่า ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ในระบบประสาทจากเซลล์มะเร็งต้นกำเนิดนั้น การทำงานร่วมกันระหว่างโครงสร้างอาร์เอ็นเอและโปรตีนมีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท และมีความสำคัญในกระบวนการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ในระบบประสาทอีกด้วย

Copyright© by Mahidol University

161 หน้า